

Patent Number: FR2766192
Publication date: 1999-01-22
Inventor(s): NGUYEN THIEN NGOC;; POWER ULTAN;; BECK ALAIN;; GOESTCH LILIANE
Applicant(s): PF MEDICAMENT (FR)
Requested Patent: FR2766192
Application Number: FR19970009079 19970717
Priority Number(s): FR19970009079 19970717
IPC Classification: C07K16/10; C07K14/135; C12N15/45; A61K48/00; A61K39/155; A61K39/42; C12Q1/68
EC Classification: C07K14/135, C07K16/10F
Equivalents: AU8812398, BR9810907, EP1003851 (WO9903987), A3, JP2001510039T, WO9903987

Abstract

The invention concerns a polyclonal or monoclonal antibody directed against an epitope of the protein G of the syncytial respiratory virus corresponding to a sequence selected among one of the peptide sequences included respectively between the aminoacid residues 150-159, 176-189, 194-207 and 155-176 of the entire sequence of the protein G of the syncytial respiratory virus A or B, or of sequences having at least 98 % homology.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



DL

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) Nº de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) Nº d'enregistrement national : 97 09079

(51) Int Cl⁶ : C 07 K 16/10, C 07 K 14/135, C 12 N 15/45, A 61 K
48/00, 39/155, 39/42, C 12 Q 1/68

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 17.07.97.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : PIERRE FABRE MEDICAMENT —
FR.

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 22.01.99 Bulletin 99/03.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(72) Inventeur(s) : NGUYEN THIEN NGOC, POWER
ULTAN, GOESTCH LILIANE et BECK ALAIN.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : REGIMBEAU.

(54) EPITOPES DU VRS ET ANTICORPS LES COMPORTANT, UTILES DANS LE DIAGNOSTIC ET LA THERAPIE.

(57) La présente invention concerne un anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre un épitope de la protéine G du VRS correspondant à une séquence choisie parmi l'une des séquences peptidiques comprise respectivement entre les résidus d'acides aminés 150-159, 176-189, 194-207 et 155-176 de la séquence totale de la protéine G du VRS A ou B, ou des séquences présentant au moins 98% d'homologie.

FR 2 766 192 - A1



La présente invention se rapporte au virus respiratoire syncytial, et plus particulièrement à l'identification de nouveaux épitopes et aux anticorps correspondants, utiles notamment dans le domaine du traitement, de la prophylaxie et du diagnostic des affections provoquées par ce virus.

Le virus Respiratoire syncytial (VRS) est l'un des agents étiologiques les plus fréquemment rencontrés chez le nourrisson et chez les personnes âgées. Les bronchiolites sont souvent graves chez l'enfant et nécessitent l'hospitalisation. Actuellement il n'existe pas de moyens de prévention contre la maladie due au VRS. La première infection au VRS ne prévient pas contre la suivante. Le traitement des cas graves par antibiothérapie (Ribavirine) et/ou associé avec l'immunothérapie (immunoglobulines humaines) ne peuvent pas atténuer l'aggravation de la maladie. Néanmoins, ce type de traitement reste encore très coûteux.

Les essais cliniques récents avec les anticorps monoclonaux HNK20 de ORAVAX(dirigés contre la protéine F du VRS) n'ont pas montré d'efficacité du traitement par rapport au placebo contre l'infection du VRS chez l'enfant. Dans les années 60, les tentatives d'immunisation des enfants avec un vaccin VRS inactivé à la formaline avaient pour conséquence l'aggravation de la maladie au lieu de conférer une protection des poumons contre l'infection naturelle au VRS. Associé à ce problème, les diagnostics actuels ne permettent pas d'identifier de manière fiable l'infection au VRS, au moins chez l'adulte.

Le VRS est classé dans la famille des Paramyxoviridae, genre pneumovirus comportant un génome ARN non segmenté, de polarité négative, codant pour 10 protéines spécifiques.

La demande WO 87/04185 a proposé d'utiliser des protéines structurales du VRS en vue d'un vaccin, comme les protéines d'enveloppe appelées protéine F (protéine de fusion) ou protéine G, une

glycoprotéine de 22 Kd, une protéine de 9,5 Kd, ou la protéine majeure de capsidé (protéine N).

La demande WO 89/02935 décrit les propriétés de protection de la protéine F entière du VRS, éventuellement modifiées sous forme 5 monomérique ou déglycosylée.

Une série de fragments de la protéine F a été clonée en vue de rechercher leurs propriétés neutralisantes.

Dans la demande WO 95/27787, il a été montré que la protéine G du VRS peut être utile dans la préparation de produits destinés au 10 traitement et/ou à la prévention d'affections provoquées par le VRS, sous-groupe A ou B.

Dans le cadre de la présente invention, il a maintenant été trouvé que des fragments de la protéine G du VRS, contenant des épitopes spécifiques, possèdent des propriétés particulièrement avantageuses. De 15 nouveaux fragments peptidiques de la protéine G du VRS peuvent ainsi être préparés, notamment pour les applications suivantes :

(i) ledit fragment de peptide couplé ou fusionné, par des méthodes chimiques ou par génie génétique, à un porteur, constitue un 20 vaccin efficace contre l'infection au VRS, quel que soit le mode d'administration.

(ii) les mêmes fragments peptidiques peuvent servir à générer des anticorps polyclonaux et monoclonaux qui sont très efficaces dans les traitements prophylactiques ou thérapeutiques de l'hôte infecté par le VRS.

25 (iii) ces fragments peptidiques et les anticorps monoclonaux peuvent être utilisés comme réactifs dans un Kit de diagnostic permettant d'affirmer et d'identifier l'infection chez l'hôte infecté par le VRS-A ou le VRS-B.

30 L'invention a donc pour objet des anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre un épitope de la protéine G du VRS

correspondant à une séquence choisie parmi l'une des séquences peptidiques comprise respectivement entre les résidus d'acides aminés 150-159, 176-189, 194-207 et 155-176 de la séquence totale de la 5 protéine G du VRS A ou B, ou des séquences présentant au moins 80%, et de préférence au moins 98% d'homologie.

Ces anticorps reconnaîtront des peptides portés par la séquence comprise entre les résidus d'acides aminés 130 et 230 de la protéine G du VRS, sous-groupe A ou sous-groupe B.

10 Cette région correspondant aux acides aminés 130-230 de la protéine G du VRS A est désignée ci-après G2Na. G2Na a été produite dans une bactérie telle que *E. coli*, donc non glycosylée. Elle confère, notamment lorsqu'elle est couplée à un porteur comme une OmpA de bactérie gram négatif, par exemple de *Klebsiella* (protéine p40, décrite 15 dans WO 96/14415) ou une protéine dérivée du streptocoque (comme la protéine de liaison à la sérumalbumine humaine, appelée ci-après BB, décrite dans WO 96/14416), une protection immunitaire contre les infections au VRS.

20 De manière inattendue, il a été montré qu'une série de peptides préparés selon l'invention confère une protection croisée contre le VRS sous-groupe A ou sous-groupe B.

En particulier, une protéine recombinante BBG2a1, un dérivé de BBG2Na où seulement quatre résidus ont été modifiés sur G2Na : les résidus Asn(aa191), Lys(aa192), Gly(195) et Thr(aa198) ont été 25 substitués par les résidus Ser, Asn, Lys et Pro respectivement, confère une protection croisée VRS-A ou VRS-B chez la souris BALB/c. Dans le même but de renforcer une protection croisée, deux nouvelles molécules ont été produites : BBG2a2 où les résidus Asn(aa157), Asn(aa160), Asn(aa161) et Phe(aa163) ont été substitués par les résidus Lys, Lys, 30 Asp et Tyr respectivement; BBG2a3 comporte les huits résidus modifiés de BBG2a1 et BBG2a2.

Des peptides particulièrement avantageux selon l'invention présentent notamment l'une des séquences choisies parmi les séquences ID n° 1, ID n° 2, ID n° 3, ID n° 4, ID n° 5, ID n° 6, ID n° 7, ID n° 8, ID n° 9, ID n° 10, ID n° 11, ID n° 12, ID n° 13, ID n° 14, ID n° 15, ID n° 16, ID 5 n° 17, ID n° 18, ID n° 19, ID n° 20, ID n° 21 et/ou ID n° 22, figurant en annexe ; un tel peptide peut, en outre, comporter au moins un résidu cystéine en position N-terminale ou C-terminale.

La réactivité des peptides est mise en évidence par des sondes mono ou polyclonales. Quatre régions de G2Na ont été révélées par cette 10 technique : G5a (aa144-159), G11a(aa164-176), G4a(aa172-187) et G9a(aa190-204).

L'invention a donc également pour objet des anticorps, monoclonaux ou polyclonaux, dirigés contre un peptide présentant au moins l'une des séquences ID n° 1 à ID n° 22.

15 Des peptides possédant une ou plusieurs unités correspondant aux épitopes 150-159, 176-189, 194-207 et 155-176 de la séquence de la protéine G du VRS seront très utiles pour les différents modes de mise en oeuvre de l'invention.

Des peptides selon l'invention, couplés à une protéine porteuse, 20 sont utiles comme agents immunogènes.

La protéine porteuse est avantageusement choisie parmi les OmpA de bactéries gram négatif et leurs fragments, la protéine TT (tetanus toxoïde), la protéine de liaison à la sérumalbumine humaine du Streptocoque et ses fragments et la sous-unité B de la toxine cholérique 25 (CTB) ; de préférence, la protéine porteuse est une OmpA d'une bactérie du genre Klebsiella.

Selon l'un des aspects de l'invention, le peptide est conjugué à la protéine porteuse par une protéine de liaison ; cette protéine de liaison peut notamment être choisie parmi un récepteur de l'albumine sérique

de mammifère et les récepteurs présents à la surface des cellules mucosales.

Le couplage est de préférence un couplage covalent, qui peut être réalisé par la voie chimique ou par des techniques d'ADN recombinant.

5 Selon un autre de ses aspects, l'invention a donc pour objet une séquence nucléotidique codant pour un peptide ou un agent immunogène tel que définis précédemment. Il peut s'agir notamment d'une molécule d'ADN hybride produite par insertion ou fusion dans la molécule d'ADN codant pour la protéine porteuse, de l'ADN codant pour 10 un peptide selon l'une des revendications 4 ou 5 ou l'un de leurs fragments, fusionné avec un promoteur ; il peut également s'agir d'une molécule d'ARN.

15 Les peptides, les anticorps, les agents immunogènes et les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisés à titre de médicament, et plus particulièrement pour la préparation d'une composition destinée au traitement préventif ou curatif des affections provoquées par le VRS, sous-groupe A ou B.

Par exemple, des anticorps monoclonaux reconnaissant de manière spécifique les peptides G5a et G11a et G1ΔCa ont été générés. 20 Le transfert passif des anticorps monoclonaux 5C2 (anti-G5a) et 18D1 (anti- G1ΔCa) chez la souris naïve permet de prévenir l'infection au VRS-A d'une part. Et d'autre part, le même monoclonal 5C2 permet d'éliminer rapidement une infection chronique au VRS-A chez la souris immunodéprimée.

25 L'invention a donc également pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un anticorps mono ou polyclonal, un peptide ou un épitope selon l'invention, un agent immunogène, ou une séquence nucléotidique tels que définis précédemment, et des excipients pharmaceutiquement acceptables.

Les anticorps monoclonaux sont, de préférence, humanisés et produits par la voie recombinante. Selon un autre aspect de l'invention, ils sont obtenus par la méthode de librairie de phages.

Les peptides, agents immunogènes, anticorps et séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent, selon un mode de mise en oeuvre de l'invention, entrer dans la composition d'un kit de diagnostic.

Comme indiqué plus haut, les agents immunogènes peuvent être préparés par la technologie de l'ADN recombinant, par l'introduction d'une séquence nucléotidique selon l'invention dans une cellule hôte.

10 Cette séquence nucléotidique peut être un gène de fusion qu'on introduit par l'intermédiaire d'un vecteur d'ADN qui provient d'un plasmide, d'un bactériophage, d'un virus et/ou d'un cosmide. Ce gène de fusion peut, dans un mode de réalisation du procédé de préparation, être intégré dans le génome de la cellule hôte.

15 Le vecteur pourra être un vecteur viral, connu de l'homme du métier.

La cellule hôte peut être un procaryote, notamment choisie dans le groupe comprenant : *E. coli*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*.

20 Mais la cellule hôte peut également être une levure, une cellule de mammifère, une cellule d'origine végétale ou une cellule d'insecte.

Selon l'un des aspects du procédé selon l'invention, la protéine de fusion est exprimée : secrétée, localisée dans le cytoplasme, ou encore exposée à la membrane des cellules hôtes.

25 Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention. Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes.

Figure 1 et 2 : Principe du clonage des gènes G2a1, G2a2 et G2a3 dans les vecteurs.

Figure 3 : A-Gel SDS-PAGE 20%, coloration au Bleu de Comassie. M= Standards de tailles moléculaires, pistes 1 et 2 protéines BBG2a1 (masse théorique 38,7 Kd) purifiées par affinité sur HSA-Sépharose.

5 **B-** Immunoblot des protéines BBG2a1 avec un anticorps monoclonal 18 D1.

Figure 4 : A-Immunogénicité des peptides G5a et G9 a.

B- Efficacité protectrice des peptides G5a et G9a sur les poumons.

Figure 5 : A- Immunogénicité des peptides G7a et G8a.

10 B- Efficacité protectrice des peptides G7a et G8a sur les poumons.

Figure 6 : Immunogénicité de BBG2a1 vis-à-vis du VRS A (Figure 6A) et VRS B (6B) et efficacité protectrice contre le VRS A (6C) et le VRS B (6D).

15 **Figure 7 :** Effet curatif des anticorps monoclonaux 18D1 et 5C2.

Figure 8 : A- Efficacité prophylactique de l'anticorps monoclonal 18D1.

B- Efficacité prophylactique de l'anticorps monoclonal 5C2.

20 **Figure 9 :** Identification des épitopes B de G2Na représentés dans un sérum de souris immunisées par BBG2Na. A : révélation totale ; B : absence de révélation de la région 155-176.

Figure 10 : Détermination de la zone de reconnaissance de l'anticorps monoclonal 5B7 par la méthode du Pepscan B.

25 **EXEMPLES**

Exemple 1 : Synthèse des peptides.

• **Exemple de la synthèse des peptides G5aCys et CysG5a.**

Abréviations :

	AA :	acide aminé
	Boc :	tert Butoxycarbonyl
	BHA :	Bromo hydrosuccimidyl acide
5	CE :	Capillary Electrophoresis
	ES-MS :	Electrospray - Mass spectrometry
	FMOC :	fluorenylmethoxycarbonyl
	FZCE :	Free Zone Capillary Electrophoresis
	HBTU :	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium 10 hexafluorophosphate
	HMP :	p-Hydroxyméthylphénoxyméthyl polystyrène
	MBHA :	méthylbenzhydrylamine
	NMP :	N-méthyle-2-pyrrolidone
	Pmc :	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
15	RP-HPLC :	Reverse Phase - High Performance Liquide Chromatography
	SPPS :	Synthèse Peptidique en Phase Solide
	tBOC :	t-butyloxycarbonyl
	tBu :	tertio Butyl
	TFA :	trifluoroacetic acid
20	Trt :	trityle

Le peptide G5a est un peptide de 16 acides aminés qui correspond au fragment de la protéine G (144-159) du VRS-A. Il est obtenu par synthèse chimique sur phase solide en partant du côté C vers le côté N-terminal. Les peptides CysG5a et G5aCys correspondent respectivement à ce peptide avec une Cystéine supplémentaire du côté N ou C-terminal qui est destinée à un couplage univoque sur une protéine porteuse. Ces 2 peptides permettent d'étudier l'influence que peut avoir l'orientation du peptide conjugué à une protéine porteuse sur la réponse immunologique observée.

Les peptides ont été synthétisés à l'aide d'un synthétiseur automatique de peptide en phase solide du côté C vers le côté N-terminal (chimie FMOC à l'échelle de 0.1 ; 0.25 ou 1.0 mmole). La synthèse du peptide CysG5a est effectuée à partir d'une Proline préchargée sur une résine de type HMP, qui permet après clivage d'obtenir une fonction acide libre du côté C-terminal ou une résine de type Rink amide MHBA, qui permet après clivage d'obtenir une fonction amide du côté C-terminal. Celle du peptide G5aCys débute par une Cystéine préchargée sur l'une ou l'autre des résines. Les fonctions réactives des chaînes latérales des acides aminés utilisés, sont protégées par des groupes compatibles avec la chimie FMOC [Cys(Trt) ; Arg(Pmc) ; Asn(Trt) ; Gln (Trt) ; Lys(Boc) ; Ser(tBu) ; Thr(tBu)]. Un cycle de couplage se déroule de la manière suivante : déprotection de la fonction amine N-terminale du premier acide aminé à l'aide de pipéridine, activation de la fonction acide du deuxième acide aminé à coupler à l'aide d'HBTU/HMP et couplage. En fin de synthèse, le peptide est clivé de la résine et les chaînes latérales sont déprotégées par réaction avec un mélange eau / TFA. Le peptide est précipité à l'éther refroidi préalablement à -40°C et le mélange est centrifugé. Le culot est lavé à trois reprises avec de l'éther puis séché à l'azote. Le culot est repris avec de l'eau contenant 0.1 % de TFA. La suspension est à nouveau centrifugée et le surnageant qui contient le peptide est séparé du culot, qui contient la résine. Le peptide brut est purifié par HPLC en phase inverse semi-préparative. L'homogénéité du peptide purifié est vérifiée par HPLC en phase inverse et par électrophorèse capillaire (FZCE). La structure théorique est confirmée par comparaison de la compatibilité de la masse mesurée par spectrométrie de masse de type ES-MS, avec la masse calculée à partir de la séquence théorique en acides aminés.

.Peptide CysG5aNH2**Synthèse :**

5 Poids théorique peptide-résine en fin de synthèse: 593 mg
Poids mesuré après séchage à l'azote : 619 mg
Clivage peptide-résine et analyse du peptide brut : 200 mg (1/3 du lot)
Masse de peptide brut clivé après lyophilisation : 84 mg (75 % de
quantité nette de peptide soit 97 % de rendement)

10 Homogénéité du peptide brut : 97 % (RP-HPLC ;
UV 210 nm)
 97 % (FZCE/
MicrocoatTM)

15 Purification :

Masse de peptide purifié après lyophilisation : 50 mg (75 % de
quantité nette de peptide soit 58 % de rendement)

Caractérisation :

Homogénéité du peptide purifié : > 99 % (RP-HPLC ; UV 210 nm)
20 > 99 % (FZCE/ MicrocoatTM ; UV 200
nm)

Spectrométrie de masse (ES-MS)

Masse calculée : 1951.29 Da
25 Masse mesurée : 1950.80 Da ± 0.31

Exemple 2 : Couplage des peptides G5a, G7a, G8a, G9a, G11a et G11ΔCa sur une protéine porteuse (P40, BB, TT, KLH).

• Exemple du couplage du peptide G11ΔCa sur la protéine P40.

5 Le peptide G11ΔCa (Seq ID n° 14) est un peptide de 13 acides aminés issu de la protéine G du VRS. Il correspond à la séquence 164-176 de cette protéine. Lors de la synthèse, le résidu Cys en position 173 a été remplacé par un résidu Ser afin de ne conserver qu'un seul résidu Cys en position 176 et éviter la formation d'un pont disulfure 1-2 10 n'existant dans la protéine G naturelle (appariement 1-4/2-3).

15 Ce peptide a été couplé à l'aide de glutaraldéhyde (réactif homobifonctionnel, couplage sur les fonctions amines et thiols) ou de manière univoque à l'aide de BHA (réactif hétérobifonctionnel, couplage sur la fonction thiol de la Cystéine en position C-terminale).

15 **• Couplage univoque par le BHA**

• Solubilisation du peptide G11ΔCa.

20 2 mg de G11ΔCa sont solubilisés dans 2 ml de tampon phosphate 0,1M pH 7 + 0,1% Zwittergent 3-14.

• Couplage univoque sur la protéine P40 à l'aide d'un réactif hétérobifonctionnel (BHA).

25 3 mg de BHA en solution dans 25 µl de DMF sont ajoutés à 2,5 mg de protéine P40 préalablement dialysés contre un tampon phosphate 0,1M pH7 + 0,1 % Zwittergent 3-14 et agités pendant 1 heure à

température ambiante. Après dessalage sur colonne PD10 et élution avec un tampon phosphate 0,1M pH 7 + 0,1 % Zwittergent 3-14 des fractions de 500 µl sont collectées et les tubes contenant la protéine bromoacétylée sont rassemblées (lecture de DO à 280 nm) dans des

tubes contenant 0,95 ml de solution du peptide G11ΔCa sont ajoutés. Le milieu réactionnel est saturé avec de l'azote et agité à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante. La solution est dialysée ensuite à l'aide d'un tampon phosphate 0,1 M pH 7 + 0,1% Zwittergent

5 3-14 pendant une nuit à +4°C sous agitation et la solution obtenue est conservée congelée.

• **Couplage sur la protéine P40 à l'aide d'un réactif homobifonctionnel (glutaraldéhyde).**

10 10 mg de P40 sont dialysé contre un tampon phosphate 0,1 M pH 7 + 0,1% Zwittergent 3-14. La concentration est ajustée à 2 mg/ml à l'aide d'un tampon carbonate 0,1 M pH 9 + 0,1% Zwittergent 3-14. 200 mg de SDS d'une solutiouon à 4% sont ajoutés.

15 55,5 µl de glutaraldéhyde à 2,5 % sont ajoutés à 2,5 ml d'une solution de peptide G11ΔCa à 1 mg/ml dans un tampon carbonate 0,1 M pH 9 + 0,1% Zwittergent 3-14 à un pH se situant entre 9 et 10. Le milieu réactionnel est agité à + 4°C pendant 24 heures puis ramené à température ambiante. 25 µl de lysine 1 M sont ajoutés pour bloquer la réaction. La solution est dialysée contre du tampon phosphate 0,1 M pH 7 + 0,1 % Zwittergent 3-14 pendant 24 heures à +4°C sous agitation. Le dialysat est récupéré et le SDS éliminé par précipitation à l'aide d'une solution de KCl 0,02 M à 6 reprises. Le dernier surnageant qui contient le conjugué P40-G11ΔCa glutaraldéhyde est conservé sous forme congelée à -20°C.

20

25

• **Stérilisation des conjugués**

Les conjugués sont décongelés, filtrés stérilement (0,22 µm), aliquotés et conservés à +4°C afin d'éviter les problèmes de précipitation.

• **Caractérisation analytique des conjugués**

Les conjugués sont caractérisés par dosage des protéines par la méthode de Lowry, électrophorèse de type SDS-PAGE (révélation au bleu de Coomassie) et par dosage des acides aminés après hydrolyse acide en phase gazeuse, dérivation par le PITC et analyse par HPLC.

5

Conjugué	Volume (ml)	[prot] mg/ml	Nb de G11ΔC Fixés	[G11ΔC] mg/ml
rP40-G11ΔCa (BHA)	2,7	0,74	2	0,05
rP40-G11ΔCa (glutaraldéhyde)	5,1	1,29	16	0,49

Exemple 3 : Clonage de gène G2a1, G2a2 dans vecteur d'expression

pvaBB308 et production de protéines de fusion BBG2a1 et BBG2a2

10 **dans E. coli**

Le principe de clonage de gène G2a1 (Seq ID n° 15), G2a2 (Seq ID n° 16) et de G2a3 (Seq ID n° 17) dans les vecteurs est explicité dans les figures 1 et 2

15

3.1 Construction de G2a1

Le gène codant pour la protéine G2a1 (Seq ID n° 15) est construit par mutagénèse dirigée en utilisant comme matériel de départ le plasmide pRIT28G2Na. Pour cela deux réactions de PCR (Polymerase chain reaction) sont réalisées avec les couples d'oligonucléotides

20 RIT29/TH137(PCR 1) d'une part et RIT30/TH136 (PCR 2)d'autre part dans les conditions suivantes :

PCR	(94°C 15 secondes
25 cycles	(55°C 30 secondes
	(72°C 30 secondes

25

- Fixation sur les billes magnétiques

Les fragments obtenus respectivement de 262 pb et 208 pb pour les réactions 1 et 2 sont fixés sur des billes magnétiques. 25 µl de billes magnétiques DYNAL® M-280 couplées à la streptavidine sont préalablement rincées deux fois avec du tampon T.E. (Tris 10 mM; EDTA 1mM, pH 7,5) puis mis à incuber 20 minutes à 37°C avec 90µl des réactions d'amplification 1 et 2. Après fixation les fragments sont dénaturés en incubant les billes magnétiques avec 50µl de NaOH 0,15 M pendant 10 minutes à température ambiante. Les deux surnageants sont récupérés, précipités à l'éthanol absolu et resuspendus dans 50 µl d'H₂O.

• Réaction d'extension

15 Celle-ci est réalisée par PCR en prenant 10 µl de chacune des réactions d'amplification dans les conditions ci-dessous :

(95°C 15 secondes

5 cycles (35°C 30 secondes)

(72°C 30 secondes

Le fragment généré est amplifié par PCR avec les oligonucléotides
20 RIT27 et RIT28:

(95°C 15 secondes)

25 cycles (55°C 30 secondes)

(72°C 30 secondes

Le fragment amplifié de 509 pb est digéré avec les enzymes de restrictions *Pst*I et *Hind*III. Le fragment généré de 169 pb est cloné dans le vecteur pRIT28 digéré par les mêmes enzymes.

Le plasmide obtenu pRIT28G2a1 down est séquencé avec la chimie des Dye Deoxy Terminator selon le protocole décrit par Applied Biosystem (Perkin Elmer).

Le plasmide pRIT28G2a1 est obtenu en clonant le fragment *PstI/HindIII* de pRIT28G2a1down (fragment en aval du site *Pst I*) dans le vecteur pRIT28G2Na.

Le gène G2a1 est ensuite cloné dans le vecteur d'expression pvaBB308 5 aux sites de restriction *EcoRI/HindIII* générant le vecteur pvaBBG2a1.

La liste des séquences des oligonucléotides est indiquée ci-dessous:

RIT27: 5' - GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTG - 3'

RIT28: 5' - AAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG - 3'

TH136: 5' - CCGAAGAAAAAACGACGACCAAACCGACC - 3'

10 TH137: 5' - TTTTTCTTCGGTTGTTGCTCGGG - 3'

RIT29 : RIT27 biotinylé en 5'

RIT30 : RIT28 biotinylé en 5'

3.2 Construction de G2a2 (Seq ID n° 16)

15 Le principe du clonage est schématisé en bas de la figure 2.

Les couples d'oligonucléotides utilisés dans cette construction sont les suivants: RIT29/TNG193(PCR 1) d'une part et TNG192/RIT30(PCR 2) d'autre part. Les séquences des oligonucléotides sont décrites ci-dessous:

TNG192 : 5' - CCGCCGAAAAAACGAAAGACGAT - 3'

20 TNG193 : 5' - CGAAATGGTAATCGTCTTCGG - 3'

3.3 Construction de G2a3 (Seq ID n° 17)

Les deux fragments en amont et en aval du site unique *PstI* ont été rassemblés sur le même vecteur pour donner pRIT28G2a3.

25 Les trois fragments d'inserts G2a1, G2a2 et G2a3 ont été clonés dans différents vecteurs d'expression dans *E. coli*, en particulier dans nos exemples les vecteurs pvaBB308 où BB est le gène codant pour le récepteur d'Albumine. Les protéines de fusion obtenus BBG2a1,

BBG2a2 et BBG2a3 peuvent être aisément purifiées par affinité sur 30 colonne HSA-Sepharose (Human serum Albumin).

3.4 Fermentation et purification de protéines de fusion BBG2a1 et BBG2a2

Dans deux erlenmeyers contenant 250 ml de milieu TSB (Tryptic 5 Soy Broth, Difco) avec de l'Ampicilline (100 µg/ml, Sigma) et de la Tétracycline (8 µg/ml, Sigma), on inocule avec *E. coli* RV308 transformés avec les plasmides pvaBBG2a1 et pvaBBG2a2 respectivement. On incube pendant 16 heures à T° = 37°C sous agitation. 200 ml de cette culture sont inoculés dans un fermenteur (CHEMAP CF3000, ALFA 10 LAVAL) contenant 2 litres de milieu de culture. Le milieu contient (g/l) = glycérol, 5 ; sulfate d'ammonium, 2,6 ; dihydrogénophosphate de potassium, 3 ; hydrogénophosphate dipotassium, 2 ; citrate de sodium 0,5 ; extrait de levure, 1 ; Ampicilline, 0,1 ; Tétracycline 0,008 ; Thiamine, 0,07 ; sulfate de magnésium, 1 et 1 ml/l de solution de traces 15 éléments et 0,65 ml/l de solution de vitamines. Les paramètres contrôlés durant la fermentation sont : le pH, l'agitation, la température, le taux d'oxygénéation, l'alimentation de sources combinées (glycérol ou glucose). Le pH est régulé à 7,0. La température est fixée à 37°C. La croissance est contrôlée en alimentant du glycérol (87%) à un débit 20 constant (12 ml/h) pour maintenir le signal de tension de l'oxygène dissous à 30 %. Lorsque la turbidité de la culture (mesurée à 580 nm) atteint la valeur de 80 (après environ 24 heures de culture), la production des protéines est induite par addition de l'acide indole acrylique (IAA) à la concentration finale de 25 mg/l. Environ 4 heures 25 après induction, les cellules sont récoltées par centrifugation. Les rendements en biomasse obtenus sont environ 200gr de biomasse humide. Les rendements de production de BBG2a1 et de BBG2a2 sont environ de 4 à 6 mgr de protéines par gr de biomasse.

Une fraction de 30 g de biomasse humide est resuspendue dans 30 70 ml de solution de TST (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, 0,05 %

Tween 20 et EDTA 0,5 mM]. Les cellules sont désintégrées par sonication (Vibracell 72401, Sonics & Materials). Après centrifugation du lysat cellulaire, le surnageant est filtré (1,2 µm) et dilué dans 500 ml de TST. Les protéines de fusion ainsi obtenues sous formes solubles 5 sont purifiées sur colonne d'affinité : HSA-Sepharose (human serum albumin) selon le protocole décrit par (Stahl et col, J. Immunol. Methods, 1989 ; 124 : 43-52).

Le lysat insoluble, après centrifugation, est lavé une fois avec un tampon (Tris-HCl 50 mM pH 8,5 ; MgCl₂ 5 mM). Après lavage, le culot 10 est solubilisé dans 30 ml de chlorhydrate de guanidine 7 M, Tris-HCl 25 mM (pH 8,5), Dithiotreitol (DTT) 10 mM, suivi d'une incubation à 37°C pendant 2 heures. Les protéines solubilisées sont additionnées à un tampon de renaturation (Tris-HCl 25 mM (pH 8,5) ; NaCl 150 mM et 0,05 % Tween 20). La concentration du chlorhydrate de guanidine est 15 ajustée à la concentration finale de 0,5 M dans le tampon de renaturation avant l'addition des protéines de fusion solubilisées. Le mélange est incubé à température ambiante, sous agitation modérée, pendant 16 heures. Après centrifugation, les produits de fusion solubles dans le surnageant sont purifiés sur colonne HSA-Sepharose. Les 20 protéines de fusion purifiées sont analysées sur gel SDS-PAGE (12 %), sur l'appareil MINI PROTEAN II SYSTEM (BIORADS). Les protéines sont visualisées avec du Coomassie brilliant blue R250. De plus, l'analyse des protéines recombinantes par Immunoblot avec des anticorps spécifiques du VRS montre que les protéines sont antigéniques.(voir 25 exemple de gel SDS et immunoblot de BBG2a1 sur la figure 3).

Exemple 4 : Immunogénicité et efficacité protectrice des peptides G5a et G9a couplés à P40.

Matériels et méthodes.

5 Des groupes de 7 souris ont été immunisés 2 fois par voie i.p. avec 20 µg de P40-G9aCys, P40-CysG5a, ou P40-G5aCys. Des souris témoins ont été immunisées avec le PBS. L'Alhygrogel (20% v/v) a été utilisé comme adjuvant pour toutes les immunisations. Les souris ont été prélevées au sinus rétro-orbital 2 semaines après la dernière 10 immunisation pour confirmer leur séroconversion vis-à-vis le VRS-A, challengées une semaine plus tard avec 10^5 TCID₅₀ VRS-A par voie i.n., et sacrifiées 5 jours post-challenge. Les poumons ont été prélevés et le titre de virus dans les poumons déterminés.

15 Résultats.

Réponses immunes humorales.

Comme indiqué dans la Fig. 4A, l'immunogénicité du peptide G5a est dépendante de l'orientation du couplage au P40. Après couplage par la partie C-terminale du peptide, des titres en anticorps anti-VRS-A 20 faibles à modérés ont été induits dans le sérum. Par contre, après couplage par la partie N-terminale, G5a n'a pas induit de tels anticorps. En général, le peptide G9a, couplé en C-terminal à P40, a été faiblement immunogénique en terme d'induction d'anticorps anti-VRS-A. Une souris sur sept immunisées avec P40-G9acys a développé un titre 25 d'anticorps sériques anti-VRS-A élevé...

Efficacité protectrice des poumons des peptides G5a et G9a.

Comme démontré dans la Fig. 4B, et en corrélation directe avec la détection des anticorps anti-VRS-A, le peptide G5a a induit des

réponses immunes protectrices quand il était couplé en C-terminal, mais pas après couplage en N-terminal. En effet, 6 souris sur 7 immunisées avec le P40-G5acys (couplage C-terminal) ont été protégées sans évidence de virus dans les poumons, le dernier n'a eu du virus qu'à 5 la limite de détection de l'essai. Par contre, les souris immunisées avec P40-cysG5a (couplage N-terminal) ont eu des titres de virus dans les poumons aussi élevés que les souris témoins, immunisées avec le PBS. Ces résultats confirment que l'orientation du couplage de ce peptide à une protéine porteuse est capitale pour son efficacité protectrice. La 10 corrélation entre la protection et l'induction des anticorps anti-VRS-A suggère que la protection pulmonaire observée est médiée, en partie au moins, par les anticorps.

Malgré le fait que le P40-G9aCys ait été faiblement immunogénique chez la souris en termes d'induction d'anticorps 15 sériques anti-VRS-A, les poumons de 5 souris sur 7 ont été protégés contre un challenge par le VRS-A. En effet, 1 souris sur 7 n'a pas montré d'évidence de virus dans les poumons, ni même d'anticorps anti-VRS-A dans le sérum.

20 Conclusions.

Les peptides G5a et G9a contiennent des épitopes protecteurs vis-à-vis d'une infection VRS-A des poumons. L'orientation du couplage de G5a à une protéine porteuse est capitale pour son efficacité protectrice.

25

Exemple 5 : Immunogénicité et efficacité protectrice des peptides G7a et G8a.

Matériels et méthodes.

Des groupes de 3 à 4 souris ont été immunisées 2 fois par voie i.p. avec 20 µg de G7a, G8a, BB-G7a, ou BB-G8a. Des souris témoins ont été immunisées avec le PBS. L'Alhygrogel (20% v/v) a été utilisé comme adjuvant pour toutes les immunisations. Les souris ont été prélevées au sinus rétro-orbital 2 semaines après la dernière immunisation pour confirmer leur séroconversion vis-à-vis du VRS-A, 5 challengées une semaine plus tard avec 10^5 TCID₅₀ VRS-A par voie i.n., et sacrifiées 5 jours post-challenge. Les poumons ont été prélevés et les 10 voies nasales lavées. Les titres de virus dans les poumons et les voies nasales ont été déterminés.

Résultats.Réponses immunes humorales.

15 Comme indiqué dans la Fig. 5A, les peptides G7a et G8a sont tous deux immunogéniques vis-à-vis du VRS-A couplés ou non à BB. Si l'on considère les titres d'anticorps sériques, les peptides non couplés semblent être un peu plus immunogènes que les peptides couplés.

20 Efficacité protectrice des poumons des peptides G7a et G8a.

Comme indiqué dans la Fig. 5B, les poumons de toutes les souris immunisées avec les peptides G7a ou G8a, couplés ou non à BB, sont protégés contre un challenge avec le VRS-A, sans présence de virus ou seulement à la limite de détection de l'essai.

25

Conclusions.

Les peptides G7a et G8a contiennent des épitopes protecteurs vis-à-vis des poumons. Les peptides sont efficaces couplés ou non à BB.

Exemple 6 : Immunogénicité et efficacité protectrice de la protéine de fusion BBG2a1.

Matériels et méthodes.

5 Afin de déterminer l'immunogénicité et l'efficacité protectrice de BBG2a1 contre les VRS-A et B, des groupes de 3 souris ont été immunisées 2 et 3 fois, respectivement, par voie i.p. avec 20 µg de protéine à 2 semaines d'intervalle. Des souris témoins ont été immunisées avec le PBS. L'Alhygrogel (20% v/v) a été utilisé comme 10 adjuvant pour toutes les immunisations. Les souris ont été prélevées au sinus rétro-orbital 2 semaines après la dernière immunisation pour confirmer leur séroconversion vis-à-vis du VRS-A, challengées une semaine plus tard avec 10^5 TCID₅₀ VRS-A par voie i.n., et sacrifiées 5 jours post-challenge. Les poumons ont été prélevés et le titre de virus 15 dans les poumons déterminé.

Résultats.

Immunogénicité de BBG2a1 vis-à-vis des VRS-A et B.

20 Les résultats présentés dans les Fig. 6A et B démontrent que le BBG2a1 est capable d'induire des anticorps anti-VRS-A et B. Comme attendu, le titre en anticorps anti-VRS-A est bien supérieur au titre en anticorps anti-VRS-B. Néanmoins, des titres en anticorps contre les deux souches de VRS sont élevés.

25. Efficacité protectrice de BBG2a1 vis-à-vis du VRS-A et du VRS-B.

Comme indiqué dans les Fig. 6C et D, l'immunisation des souris avec BBG2a1 a induit des réponses immunitaires capables de protéger les poumons contre un challenge avec le VRS-A et contre un challenge avec le VRS-B. Les souris challengées avec le VRS-A ont été protégées

sans évidence de virus dans les poumons (2 souris /3) ou seulement à la limite de détection (1 souris /3). Les souris challengées avec le VRS-B ont été protégées, soit sans évidence de virus dans les poumons (1 souris/3) soit avec du virus qu'à la limite de détection (1 souris/3) ou 5 juste au-dessus de cette limite (1 souris/3) de détection.

Conclusions.

La protéine de fusion BBG2a1 est très immunogénique vis-à-vis du VRS-A et vis-à-vis du VRS-B. BBG2a1 est capable d'induire des réponses qui 10 protègent les poumons contre un challenge avec les 2 sous-groupes de VRS.

Exemple 7 : Obtention des anticorps 18D1, 5C2 et 5B7

Peptide d'immunisation : (i) G1 Δ Ca couplés au KLH (Keyhole 15 Limpet Haemocyanin), (ii) G2 Δ Ca et (iii) BBG2Na.

Les souris ont été immunisées à J0 avec 50 μ g d'antigène en CFA(complete Freund Adjuvant) en ip, à J14 avec 10 μ g de chaque antigène en IFA (Incomplete Freund Adjuvant) en ip, puis à J38 en iv avec 10 μ g de chaque peptide sans adjuvant. Les rates sont prélevées et 20 fusionnées avec les cellules de myélome SP2-O à J42 dans un rapport 1/1. Les hybridomes positifs contre chaque antigène sont gardés. Ces hybridomes ont été injectés à des souris pour obtenir des ascites puis les différents anticorps obtenus ont été sélectionnés sur différents peptides afin de déterminer la spécificité des anticorps obtenus. Les 25 anticorps monoclonaux 18D1, 5C2 sélectionnés par leur spécificité contre les peptides G1 Δ Ca, G5a, reconnaissent spécifiquement le VRS-A. L'anticorps monoclona 5B7 obtenu à partir de BBG2Na et reconnaissant le peptide G11a reconnaît le VRS-A.

Exemple 8 : Effet curatif des anticorps monoclonaux 18D1 et 5C2 sur l'infection chronique à VRS-A obtenue chez la souris SCID.

Matériels et méthodes.

5 Les souris C.B-17 *scid/scid* ont été challengées par voie i.n. avec 10^5 TCID₅₀ de VRS-A, sous 50 µl. Vingt six jours plus tard, les souris ont reçu par voie i.n. et à raison de 7 souris par groupe, 50 µl d'une préparation d'anticorps 18D1 ou d'anticorps 5C2 à un titre ELISA anti-VRS-A de 10^4 . Des souris témoins ont reçu du sérum anti-BB à un titre 10 ELISA anti-BB de 10^4 . Les souris ont été sacrifiées 5 jours plus tard et leurs poumons ont été prélevés pour titrage du virus.

Résultats.

15 Les résultats présentés dans la Fig. 7 démontrent que les anticorps monoclonaux 18D1 et 5C2 sont capables d'éliminer une infection chronique avec le VRS-A chez la souris SCID et ceci d'une manière stérilisante. Aucune trace de virus n'a été détectée dans les poumons au moment du sacrifice. Les résultats obtenus dans les poumons des souris traitées avec le 5C2 correspondent à la moyenne des limites de 20 détection de l'essai, limite plus élevée du fait du manque de disponibilité d'échantillon, et non pas à la présence de virus.

Conclusions.

25 Les anticorps monoclonaux 5C2 et 18D1 pourraient être utilisés comme traitement thérapeutique dans le cadre des infections pulmonaires à VRS-A.

Exemple 9 : Effet prophylactique de l'anticorps monoclonal 18D1 sur l'infection à VRS-A chez la souris.

Matériels et méthodes.

5 Un groupe de souris BALB/c naïves, séronégatives vis-à-vis du VRS-A, ont reçu par injection intrapéritonéale 200 µl d'une préparation d'anticorps 18D1 ajustée au titre ELISA anti-VRS-A de 10^5 . Un groupe de souris témoin transfert i.p. ont reçu en parallèle 200 µl d'une préparation de sérum anti-P40 (sérum irrelevant) ajustée au titre ELISA anti-P40 de 10^4 . Toutes les souris sont infectées le jour suivant par voie i.n. avec 50 µl d'une suspension virale contenant 10^5 TCID₅₀ de VRS-A. 10 Elles sont sacrifiées 5 jours plus tard pour dosage de virus dans les poumons.

15 **Résultats.**

20 Comme indiqué dans la Fig. 8A, l'anticorps 18D1 est capable après transfert i.p. d'induire une protection au niveau des poumons de souris naïves lors d'un challenge avec le VRS-A. Toutes les souris sont protégées après injection de 200µl de 18D1 au titre de 10^5 . Trois souris sur 7 sont protégées sans évidence de virus dans les poumons. Les autres montrent des traces de virus seulement à la limite de détection de l'essai (3 souris/7), ou juste au-dessus de cette limite (1 souris/7). Les souris témoin ont des titres compris entre \log_{10} 3.70 et 4.45 par gramme de poumons.

25 . .

Conclusion.

L'anticorps 18D1 est capable de prévenir une infection pulmonaire à VRS-A chez la souris BALB/c. Il démontre une efficacité prophylactique importante.

Exemple 10 : Effet prophylactique d'anticorps monoclonal 5C2 sur l'infection à VRS-A chez la souris.

5 Matériels et méthodes.

Des souris naïves séronégatives vis-à-vis du VRS-A reçoivent par transfert i.n., 50 µl d'une préparation de 5C2 ajustée au titre ELISA anti-VRS-A de 10^4 . Des souris témoins reçoivent en parallèle du sérum anti-BB ajusté au titre ELISA anti-BB de 10^4 .

10 Toutes les souris sont infectées le jour suivant par voie i.n. avec 50 µl d'une suspension virale contenant 10^5 TCID₅₀ de VRS-A. Elles sont sacrifiées 5 jours plus tard pour titrage de virus dans les poumons.

Résultats.

15 Comme le montre la Fig. 8B, toutes les souris traitées avec le 5C2 à 10^4 ont été protégées au niveau pulmonaire. Seule 1 souris sur 7 montre des traces de virus. Les souris témoin ont des titres compris entre \log_{10} 3.70 et 4.70 par gramme de poumons.

20 Conclusion.

L'anticorps 5C2 est capable de prévenir une infection pulmonaire à VRS-A chez la souris BALB/c. Il démontre une efficacité prophylactique importante.

25 **Exemple 11 : Pepscan : exemple de la synthèse multiple de 94 octapeptides couvrant la séquence de l'aa 130-230 de G2Na et se chevauchant par un acide aminé.**

Une plaque "PEPSCAN" de 96 octapeptides synthétisés en parallèle (2 peptides de contrôle + 94 peptides couvrant la séquence

130-230 de la protéine G du VRS-A) est préparée selon la technique MULTIPINT™ décrite par Geysen *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci., 1984, 81, 3998-4002.

5 Ces peptides sont synthétisés sur support solide à l'extrémité de 96 "pins" (8 x 12) complémentaires d'une plaque de microtitration ELISA dans laquelle sera effectuée directement le criblage d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux (*sera*).

• **Système de repérage des positions des pins et des puits**

10 Le système de numérotation utilisé est le suivant :

position A1(1) = Plaque n°A, ligne 1 (12 lignes) colonne 1 (position H1 en ELISA)

position A2(1) = Plaque n°A, ligne 2, colonne 1 (position H2 en ELISA)

A1(1) : peptide de contrôle # 1 : PLAQGGGG

15 A2(1) : peptide de contrôle # 2 : GLAQGGGG

A3(1) : octapeptide # 1 : TVTKNTT

A4(1) : octapeptide # 2 : VKTKNTTT

etc.....

A12(8) : octapeptide # 94 : KEVPTTKP

20

• **Synthèse**

La synthèse correspond à plusieurs cycles de déprotection, de lavages et de couplage jusqu'à obtention des séquences peptidiques désirées. A la fin de la synthèse, les peptides sont N-acétylés, avant 25 l'étape de déprotection des chaînes latérales.

Les acides aminés utilisés pour la synthèse sur pins sont protégés par un groupement Fmoc (9-Fluorénylméthoxycarbonyl) et les groupements protecteurs des chaînes latérales suivants : t-Butyle ether (tBu) pour la Sérine, la Thréonine et la Tyrosine, t-Butyle ester (OtBu) pour les Acides

Aspartique et Glutamique, t-Butoxycarbonyle (Boc) pour la Lysine, l'Histidine et le Tryptophane, 2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulfonyle (Pmc) pour l'Arginine, Trityle (Trt) pour la Cystéine, l'Asparagine et la Glutamine. L'activation de la fonction acide est effectuée avec de la 5 Diisopropylcarbodiimide (DIC) et du 1-hydroxybenzotriazole (HOEt) dissous dans du DMF.

• **Fmoc-déprotection et lavages :** La plaque de pins est immergée dans un bain contenant 200 ml d'une solution de pipéridine à 20% dans le 10 DMF (40/160 ml) pendant 20 min. à température ambiante sous agitation. Les pins sont ensuite retirés du bain. L'excès de solvant est éliminé en frappant le bloc de pins sur du papier-linge. Les pins sont lavés dans 200 ml de DMF pendant 2 min. à température ambiante sous agitation. Le bloc est frappé sur du papier-linge et immergé 15 complètement dans un bain de MeOH pendant 2 min. sans agitation. Les pins sont immergés dans 200 ml de MeOH ensuite (3 bains de 2 minutes, 200 ml/bain). La plaque est séchée pendant 30 min.

• **Couplage des Fmoc-amino-acides :** Les Fmoc-amino-acides 20 subissent une étape d'activation avant de pouvoir être couplés. La durée d'une étape de couplage est de 2 heures pour une concentration de 100mM avec 1.5 équivalent d'HOEt et 1.2 équivalent de DIC. Un logiciel permet de calculer les quantités de réactifs nécessaires pour l'étape de couplage. Les pesées sont effectuées dans des tubes classés par ordre 25 alphabétique du code à une lettre des acides aminés. Les tubes sont remplis en dehors de la balance sur une feuille de papier linge, puis pesés jusqu'à l'obtention d'une masse proche de celle indiquée sur la feuille de pesée. La masse ne doit pas être inférieure de 0.2 mg ni supérieure de 0.9 mg par rapport à la quantité théorique.

- **Etape de couplage :** Les pins sont introduits délicatement dans les puits. La boite est fermée soigneusement et laissée sous une hotte pendant la durée du couplage pendant 2h pour une concentration en acides aminés de 100mM. Un couplage de 2h permet de réaliser 3 couplages par jour.
5
- **Traitements des blocs de pins après couplage :** Les pins sont retirés de la plaque contenant les solutions de couplage et lavés avec 200 ml de MeOH sous agitation pendant 5 min. Le bloc est frappé sur du papier-linge et laisser sécher pendant 2 min. Le bloc est placé dans 200 ml de DMF et lavé pendant 5 min. sous agitation avant d'effectué le cycle suivant de déprotection. La plaque est lavée classiquement et subit l'étape de clivage des groupements Fmoc comme décrit ci-dessus après le dernier couplage.
10
- 15 • **Acétylation des amines terminales :** les tête de pins sont mises à incuber dans les puits d'une plaque contenant 150µl du mélange réactif suivant : DMF/Anhydride acétique/triéthylamine 50/5/1 (v/v/v). Le bloc est enfermé dans une boite pendant 90 min. à température ambiante. Le bloc est lavé ensuite avec 200 ml de MeOH pendant 15 min. puis séché pendant 15 min.
- 20 • **Déprotection des chaînes latérales :** les groupements protecteurs des chaînes latérales sont éliminés en immergeant les pins dans 200 ml d'un mélange TFA/anisole/Ethanedithiol 190/5/5 ml pendant 2 h 30 à température ambiante. Après cette étape de déprotection, le bloc de pins est retiré de la solution acide. La boite est rincée une fois au MeOH, puis remplie de MeOH pour y immerger complètement le bloc de pins pendant 10 min. Le bloc est alors frappé sur du papier-linge puis
25

immergé dans 200 ml d'un mélange MeOH/eau/acide acétique (100/100/1 ml) pendant 1 heure et frappé à nouveau sur du papier linge. Le bloc est mis sous-vide dans un dessicateur pendant une nuit.

5 **Exemple 12 : ELISA**

La plaque portant les pins est saturée 1 heure à 37°C en tampon de saturation (PBS, Tween 0.1%, gélatine 1%), lavée 10 min en PBS et incubée une nuit à 4°C sous agitation avec le sérum à analyser préalablement dilué. La plaque est ensuite lavée 4 fois 10min en PBS et 10 incubée une heure à température ambiante avec un anticorps secondaire marqué à la peroxydase, dilué au 1/5000 e. Après 4 lavages en PBS, le substrat TMB est ajouté. L'arrêt de la réaction est effectué par addition d'acide sulfurique.

Le résumé des données résultant de l'analyse d'un sérum murin 15 anti BBG2Na par la méthode du Pepscan B est représenté sur la figure 9.

Les figures 9A et 9B montrent une réactivité du sérum de souris anti-BBG2Na contre 4 régions de la molécule G2Na (les résidus en trait gras représentent les acides aminés jouant un rôle important dans la 20 reconnaissance Ac/Ag) :

- la région 1 située entre les résidus 150 et 159 dont la séquence est **QRQNKPPNKP**. Cette région est comprise dans le peptide G5a (144-159) et correspond à la zone de réactivité de l'anticorps monoclonal 5C2.
- la région 2 située entre les résidus 176 et 189 dont la séquence est 25 **CSNNPTCWAICKRI**. Il s'agit d'une région localisée au niveau du peptide G1ΔCa (174-187) et correspondant à la réactivité des anticorps monoclonaux 18D1 et 5D3.
- la région 3 située entre les résidus 194 et 207 dont la séquence est **PGKKTTTKPTKKPT**. Cette séquence correspond à une réactivité au

niveau du peptide G9 (194-204), réactivité déjà mise en évidence lors de la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre BBG2Na.

- la région 4 qui s'étend sur une large zone allant du résidu 155 au résidu 176 semble être le résultat de différentes réactivités. L'une de ces réactivités qui couvre une région très hydrophobe de la molécule G2Na (G11a) correspond à la zone de reconnaissance de l'anticorps monoclonal 5B7 (obtenu après immunisation de souris BALB/c par le candidat vaccin BBG2Na) dont le pepscan B est représenté ci-dessous dans la figure 10.

10 Cet anticorps monoclonal reconnaît la séquence **FEVFNFVP** (165-172).

15 L'ensemble des quatre réactivités ci-dessus a par ailleurs été confirmé par la titration du sérum anti-BBG2Na au moyen de différents ELISA mis au point pour chacune des réactivités. Le tableau I montre que le sérum anti-BBG2Na présente bien des activités "anti-G4a, G5a cys, G9a cys et G11a".

Tableau I : Titres anti-G4a, G5aCys, G9aCys et G11 Δ Ca exprimés en log₁₀ du sérum anti-BBG2Na ref. BE-02.

20

Titre(log ₁₀)	BE - 02
G2Na	5.9
KLH-G4a	4.7
KLH-	5.0
G9aCys	
KLH-	3.8
G5aCys	
P40-G11ΔCa	3.5

Conclusion :

L'étude d'un sérum anti-BBG2Na par la technique du Pepscan montre que l'immunisation de souris avec BBG2Na génère des anticorps contre 4 épitopes B situés respectivement dans les régions 150-159, 5 176-189, 194-207 et 155-176. Cette technique permet donc de confirmer l'importance de la région 164-176 (G11 Δ Ca).

Ces résultats sont, par ailleurs, en parfait accord avec les données ELISA concernant la réactivité d'un sérum anti-BBG2Na sur les peptides G4a, G5aCys, G9aCys et G11 Δ Ca.

LISTE DE SÉQUENCES

Information pour la SEQ ID NO : 1 GLACa

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés, 42 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

174	176	182	186 187
N - Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys - C			
5'- AGC ATC TGC ACC AAC AAC CGG ACC TGC TGG CGG ATC AGC AAA - 3'			

Information pour la SEQ ID NO : 2 GL'ACa

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés
 LONGEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

174	176	182	186 187
N - Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys - C			

Information pour la SEQ ID NO : 3 GLACb

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés, 42 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

174	176	182	186 187
N - Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys - C			
5'- AGC ATC TGC GCC AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC AGC AAA - 3'			

Information pour la SEQ ID NO : 4 G1'Acb

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés
 LONGEUR DE LA SEQUENCE : 14 acides aminés
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

174 176 182 186 187
 N - Ser Ile Asp Gly Asn Asn Gln Leu Orn Lys Ser Ile Ser Lys - C

Information pour la SEQ ID NO : 5 G5a

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGEUR DE LA SEQUENCE : 16 acides aminés, 48 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

144 159
 N - Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro - C
 5' - AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC AAC CCG - 5'

Information pour la SEQ ID NO : 6 G5b

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGEUR DE LA SEQUENCE : 16 acides aminés, 48 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

144 159
 N - Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro - C
 5' - AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 7 G7a

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 33 acides aminés, 99 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

	158	173
N - Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile		
5' - AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GIG TIC AAC TTC GIG CCG TGC ACC ATC		
176	182	186
Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro - C		
TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG - 3'		

Information pour la SEQ ID NO : 8 G7b

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 33 acides aminés, 99 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

	158	173	176
N - Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly			
5' - AAA CCG AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GIG TIC AAC TTC GIG CCC TGC AGC ATC TGC GGC			
182	186	190	
Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro - C			
AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA ACC ATC ATC CCG - 3'			

Information pour la SEQ ID NO : 9 G8a

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 43 acides aminés, 129 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire
 TYPE DE MOLECULE : protéine

	158	173	176
N - Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser			
5' - AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GIG TIC AAC TTC GIG CCG TGC ACC ATC TGC AGC			
182	186	197	
Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Pro Gly Lys Lys Thr			
AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA CCG GGC AAA AAA ACC			
200			
Thr Thr - C			
ACG ACC - 3'			

Information pour la SEQ ID NO : 10 G9b

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGEUR DE LA SEQUENCE : 43 acides aminés, 129 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

158		173	176
N - Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly			
5' - AAA CCG AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GIG TTC AAC TTC GIG CCC TGC AGC ATC TGC GGC			
178	182	186	198
Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys Pro			
AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA ACC ATC CCG AGC AAC AAA CCG AAA AAG AAA CCG			
200			
Thr Ile - C			
ACC ATC - 3'			

Information pour la SEQ ID NO : 11 G9a

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGEUR DE LA SEQUENCE : 15 acides aminés, 45 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

190		204
N - Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys - C		
5' - CCG AAC AAA AAA CCG GGC AAA AAA ACC AGC ACC AAA CCG ACC AAA - 3'		

Information pour la SEQ ID NO : 12 G9b

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGEUR DE LA SEQUENCE : 15 acides aminés, 45 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

190		204
N - Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys Pro Thr Ile Lys Pro Thr Asn - C		
5' - CCG AGC AAC AAA CCG AAA AGC AAA CCG ACC ATC AAA CCG ACC AAC - 3'		

Information pour la SEQ ID NO : 13 G11a

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGEUR DE LA SEQUENCE : 13 acides aminés, 39 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

164

176

N - His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys -C
5' - CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CGG TGC AGC ATC TGC -3'

Information pour la SEQ ID NO : 14 GL1ACa

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 13 acides aminés, 39 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

164

176

N - His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys -C
5' - CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CGG AGC AGC ATC TGC -3'

Information pour la SEQ ID NO : 15 G2a1

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 101 acides aminés, 303 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

130

N - Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys
5' - ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACC ACC CAG ACC CAG CAG CGG AGC AAA CGG ACC ACC AAA

150

Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe
CAG CGT CAG AAC AAA CGG CGG AAC AAA CGG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TIC AAC TTC

171 173 176

182

186

191

Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Ser
GIG CGG TGC AGC ATC TGC AGC AAC AAC CGG ACC TGC TGG CGG ATC TGC AAA CGT ATC CGG AGC

192 195 198

Asn Lys Pro Lys Lys Pro Thr Thr Lys Pro Thr Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys
AAC AAA CGG AAG AAA AAA CGG ACC ACC AAA CGG ACC AAA AAA CGG ACC TTC AAA ACC ACC AAA

213

230

Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro - C

AAA GAT CAT AAA CGG CGG ACC ACC AAA CGG AAA GAA GTG CGG ACC ACC AAA CGG - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 16 G2a2

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 101 acides aminés, 303 nucléotides

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

130
 N - Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys
 5' - ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACC ACG ACC CAG CAG CCG ACC AAA CCG ACC ACC AAA
 150 157 160 161 163
 Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe
 CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAA AAA CCG AAA GAC GAT TAC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC
 171 173 176 182 186
 Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn
 GTG CCG TGC AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG CCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AAC
 192
 Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Lys Pro Thr Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys
 AAA AAA CCG GGC AAA AAA ACC ACC AAA CCG ACC AAA AAA CCG ACC ACC TTC AAA ACC ACC AAA
 213 230
 Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro - C
 AAA GAT CAT AAA CCG CAG ACC ACC AAA CCG AAA GAA GTG CCG ACC ACC AAA CCG - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 17 G2a3

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 101 acides aminés, 303 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

130
 N - Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys
 5' - ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACC ACG ACC CAG CAG CCG ACC AAA CCG ACC ACC AAA
 150 157 160 161 163
 Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe
 CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAA AAA CCG AAA GAC GAT TAC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC
 171 173 176 182 186 191
 Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Ser
 GTG CCG TGC AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG CCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AGC
 192 195 198
 Asn Lys Pro Lys Lys Pro Thr Thr Lys Pro Thr Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys
 AAC AAA CCG AAG AAA AAA CCG ACC AAA CCG ACC AAA AAA CCG ACC ACC TTC AAA ACC ACC AAA
 213 230
 Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro - C
 AAA GAT CAT AAA CCG CAG ACC ACC AAA CCG AAA GAA GTG CCG ACC ACC AAA CCG - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 18 G9v

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 15 acides aminés, 45 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : protéine

190 204
 N - Thr Glu Arg Ala Pro Ser Arg Ala Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys - C
 5' - ACG GAA AGA GCA CCA AGC AGA GCA CCA ACA ATC ACC CTC AAA AAG - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 19 G5v

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 16 acides aminés, 48 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

144 159
 N - Arg Lys Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His - C
 5' - AGA AAA CCA CCA ATT AAT CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 20 G4A

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés, 42 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

171 173 176 182 186 187
 N - Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys - C
 5' - GTG CCG TGC AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG CGG ATC TGC AAA - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 21 G4B

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés, 42 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

171 173 176 182 186 187
 N - Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys - C
 5' - GTG CCC TGC AGC ATC TGC CGC AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA - 3'

Information pour la SEQ ID NO : 22 G4V

TYPE DE SEQUENCE : acides aminés et nucléotides
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 17 acides aminés, 51 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : simple
 CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : peptide

171 173 176 182 186 187
N - Val Pro Cys Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu Ala Cys Leu Ser Leu Cys His - C
5' - GTT CCC TGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT GCA TGC TTA TCA CTC TGC CAT - 3'

REVENDICATIONS

1. Anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre un épitope de la protéine G du VRS correspondant à une séquence choisie 5 parmi l'une des séquences peptidiques comprise respectivement entre les résidus d'acides aminés 150-159, 176-189, 194-207 et 155-176 de la séquence totale de la protéine G du VRS A ou B, ou des séquences présentant au moins 80% d'homologie.
2. Anticorps selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils 10 sont dirigés contre un peptide porté par la séquence comprise entre les résidus d'acides aminés 130 et 230 de la protéine G du VRS, sous-groupe A ou sous-groupe B.
3. Anticorps selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre un peptide présentant au moins l'une des 15 séquences ID n° 1, ID n° 2, ID n° 3, ID n° 4, ID n° 5, ID n° 6, ID n° 7, ID n° 8, ID n° 9, ID n° 10, ID n° 11, ID n° 12, ID n° 13, ID n° 14, ID n° 15, ID n° 16, ID n° 17, ID n° 18, ID n° 19, ID n° 20, ID n° 21 et/ou ID n° 22.
4. Peptide susceptible de générer un anticorps selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il présente au moins une des 20 séquences choisies parmi les séquences ID n° 1, ID n° 2, ID n° 3, ID n° 4, ID n° 5, ID n° 6, ID n° 7, ID n° 8, ID n° 9, ID n° 10, ID n° 11, ID n° 12, ID n° 13, ID n° 14, ID n° 15, ID n° 16, ID n° 17, ID n° 18, ID n° 19, ID n° 20, ID n° 21 et/ou ID n° 22.
5. Peptide selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il 25 comporte en outre au moins un résidu cystéine en position N-terminale ou C-terminale.
6. Agent immunogène, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un peptide selon l'une des revendications 4 ou 5, couplé à une protéine porteuse.

7. Agent immunogène selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine porteuse est choisie parmi les OmpA de bactéries gram négatif et leurs fragments, la protéine TT, la protéine de liaison à la sérumalbumine humaine du Streptocoque et ses fragments et la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB).

8. Agent immunogène selon l'une des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que la protéine porteuse est une OmpA d'une bactérie du genre Klebsiella.

9. Agent immunogène selon l'une des revendications 6 à 8, caractérisé en ce que le peptide est conjugué à la protéine porteuse par une protéine de liaison.

10. Agent immunogène selon la revendication 9, caractérisé en ce que la protéine de liaison est choisie parmi un récepteur de l'albumine sérique de mammifère et les récepteurs présents à la surface des cellules mucosales.

11. Agent selon l'une des revendications 6 à 10, caractérisé en ce que le couplage est un couplage covalent.

12. Séquence nucléotidique codant pour un agent immunogène selon l'une des revendications 6 à 11.

13. Séquence nucléotidique selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une molécule d'ADN hybride produite par insertion ou fusion dans la molécule d'ADN codant pour la protéine porteuse, de l'ADN codant pour un peptide selon l'une des revendications 4 ou 5 ou l'un de leurs fragments, fusionné avec un promoteur.

14. Séquence nucléotidique selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une molécule d'ARN.

15. A titre de médicament, anticorps selon l'une des revendications 1 à 3, peptide selon l'une des revendications 4 ou 5, agent immunogène selon l'une des revendications 6 à 11, ou séquence nucléotidique selon l'une des revendications 12 à 14.

5 16. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un anticorps selon l'une des revendications 1 à 3, un peptide selon l'une des revendications 4 ou 5, un agent immunogène selon l'une des revendications 6 à 11, ou une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 12 à 14, et des excipients pharmaceutiquement acceptables.

10 17. Utilisation d'au moins un anticorps selon l'une des revendications 1 à 3, d'au moins un peptide selon l'une des revendications 4 ou 5, agent immunogène selon l'une des revendications 6 à 11, ou séquence nucléotidique selon l'une des revendications 12 à 14, pour la préparation d'une composition destinée au traitement préventif ou curatif des affections provoquées par le VRS, sous-groupe A ou B.

15 18. Kit de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend un anticorps selon l'une des revendications 1 à 3, un peptide selon l'une des revendications 4 ou 5, un agent selon l'une des revendications 6 à 11 ou une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 12 à 14.

20 19. Procédé de préparation d'un agent immunogène selon l'une des revendications 6 à 11, caractérisé en ce que le couplage entre le peptide et la protéine porteuse est réalisé par voie chimique.

25 20. Procédé de préparation d'un agent immunogène selon l'une des revendications 6 à 11, caractérisé en ce que le couplage est réalisé par la technologie de l'ADN recombinant.

21. Procédé de préparation selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on introduit une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 12 à 14 dans une cellule hôte.

5 22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique est un gène de fusion qu'on introduit par l'intermédiaire d'un vecteur d'ADN qui provient d'un plasmide, d'un bactériophage, d'un virus et/ou d'un cosmid.

10 23. Procédé selon l'une des revendications 21 ou 22, caractérisé en ce que le gène de fusion est intégré dans le génome de la cellule hôte.

24. Procédé selon l'une des revendications 21 à 23, caractérisé en ce que la cellule hôte est un procaryote.

15 25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que la cellule hôte est choisie dans le groupe comprenant : *E. coli*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*.

26. Procédé selon les revendications 21 à 23, caractérisé en ce que la cellule hôte est une levure.

27. Procédé selon les revendications 21 à 23, caractérisé en ce que la cellule hôte est une cellule de mammifère.

20 28. Procédé selon les revendications 21 à 23, caractérisé en ce que la cellule hôte est une cellule d'origine végétale.

29. Procédé selon les revendications 21 à 23, caractérisé en ce que la cellule hôte est une cellule d'insecte.

30. Procédé selon les revendications 21 à 23, caractérisé en ce que l'on utilise un vecteur viral.

25 31. Procédé selon l'une des revendications 20 à 27, caractérisé en ce que la molécule de fusion est exprimée, ancrée et exposée à la membrane des cellules hôtes.

32. Composition utile selon la revendication 16 en ce que les anticorps monoclonaux sont humanisés et produits par la voie recombinante.

33. Composition utile selon la revendication 16 en ce que les 5 anticorps monoclonaux sont obtenus par la méthode de librairie de phages.

1/10

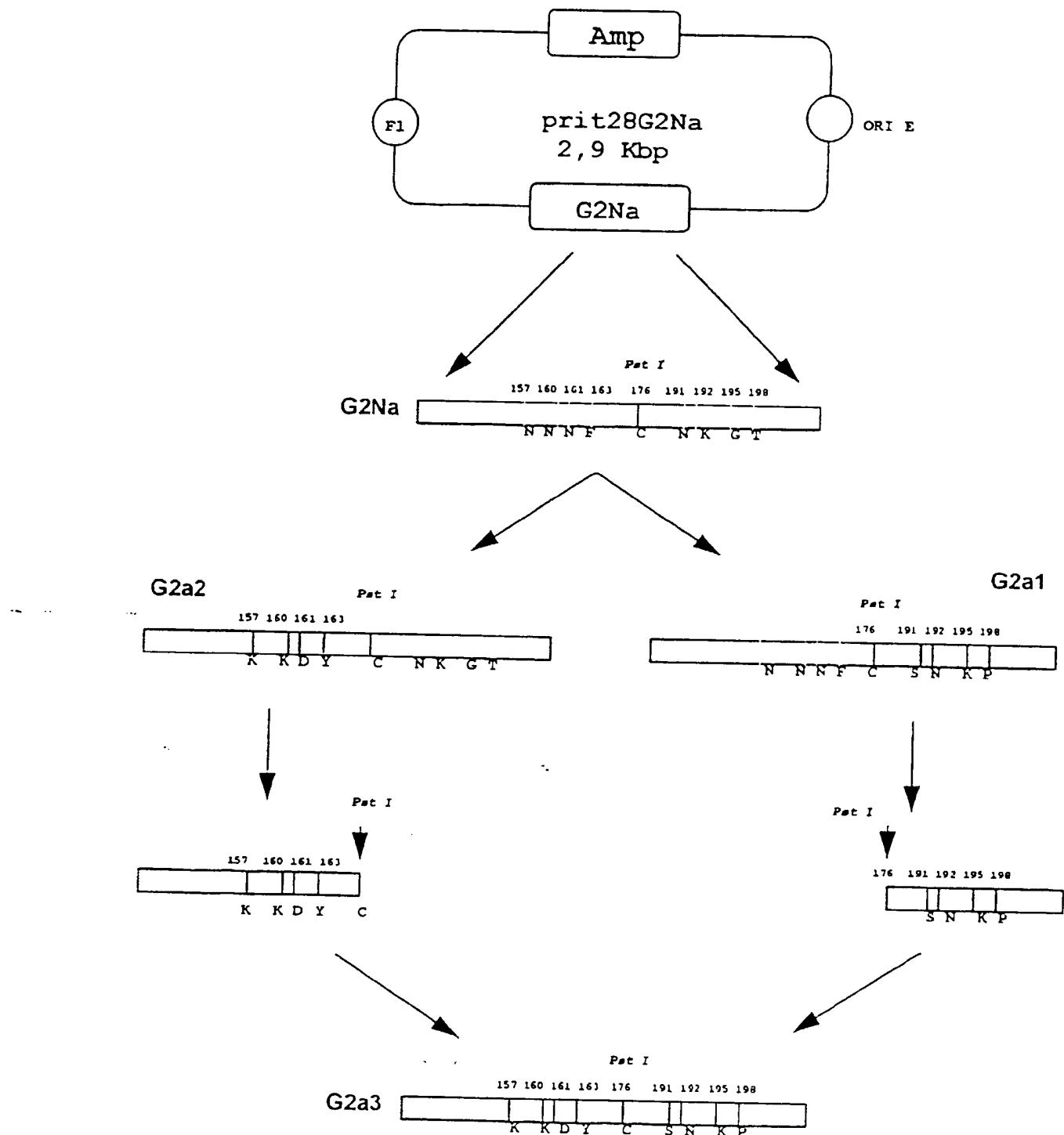


Figure 1

2 / 10

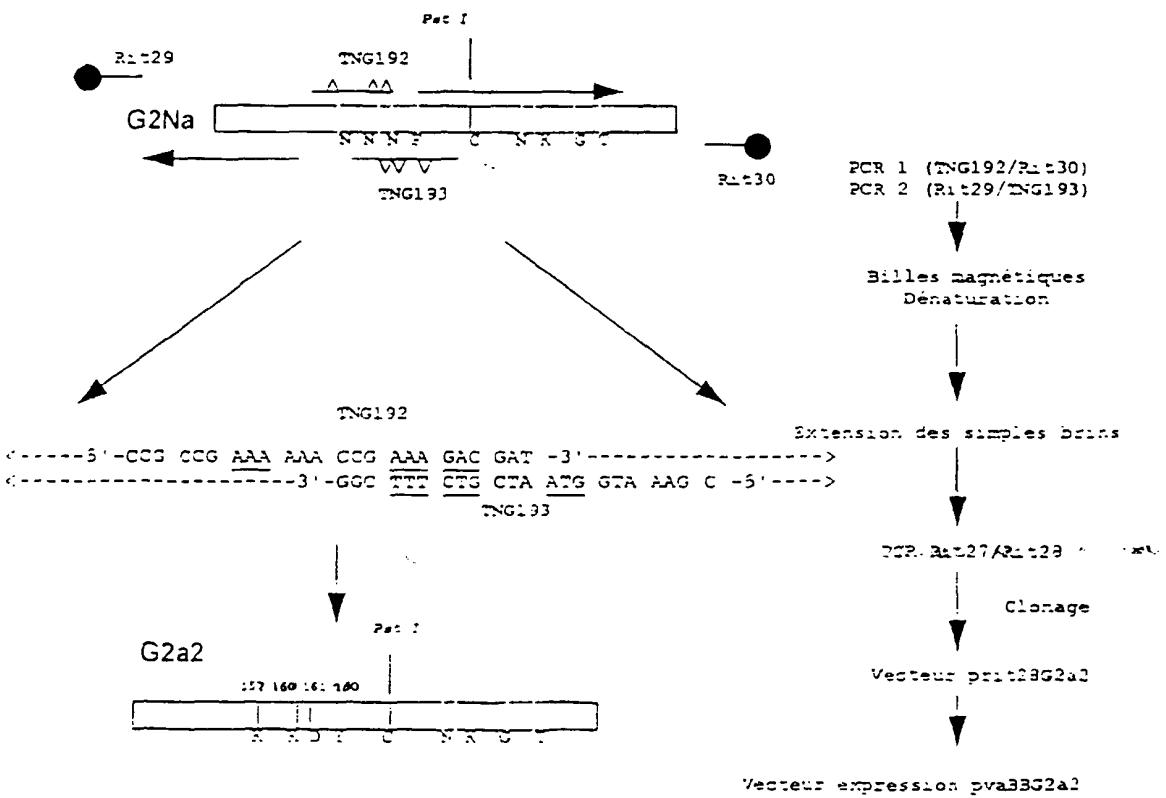
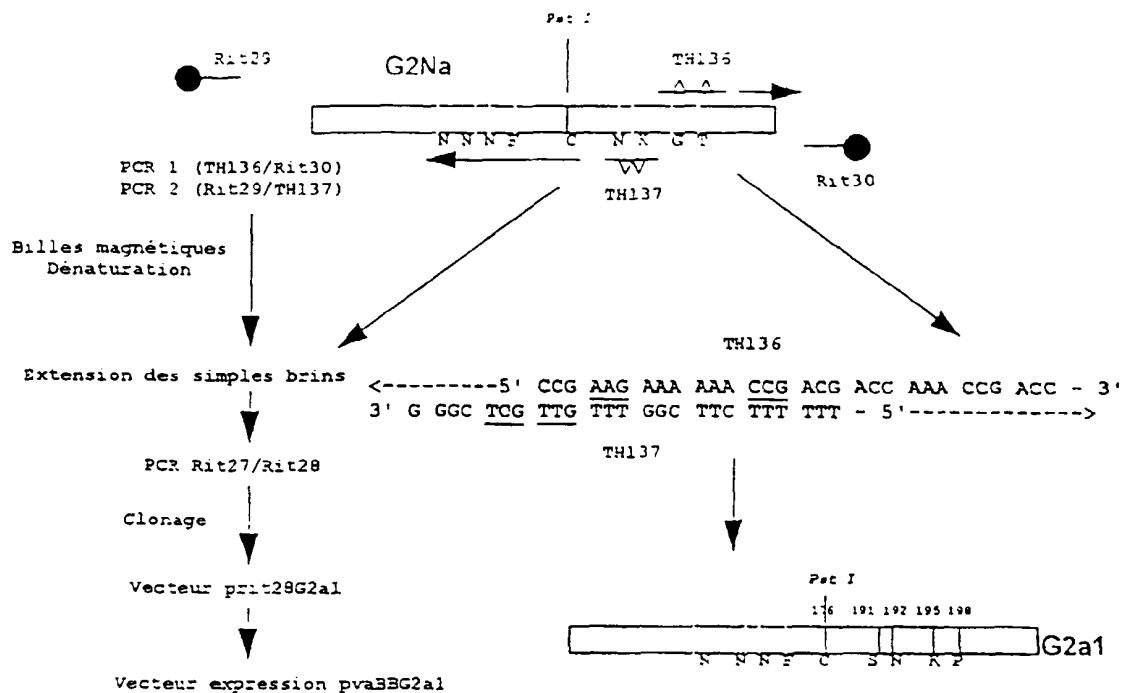


Figure 2

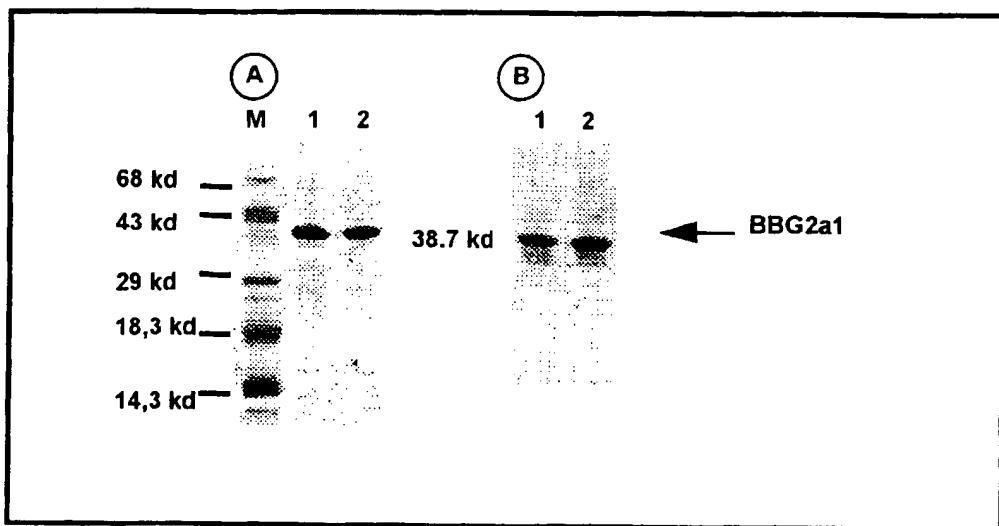


Figure 3

4/10

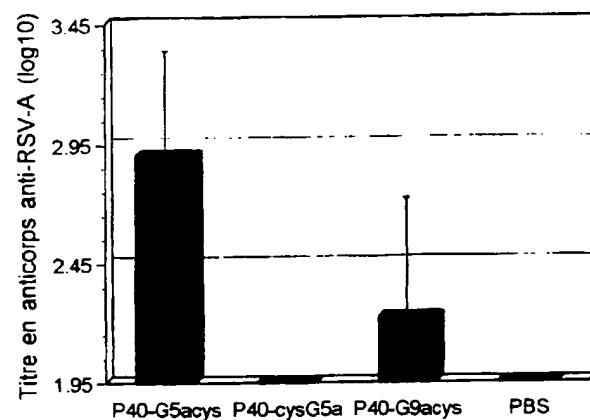
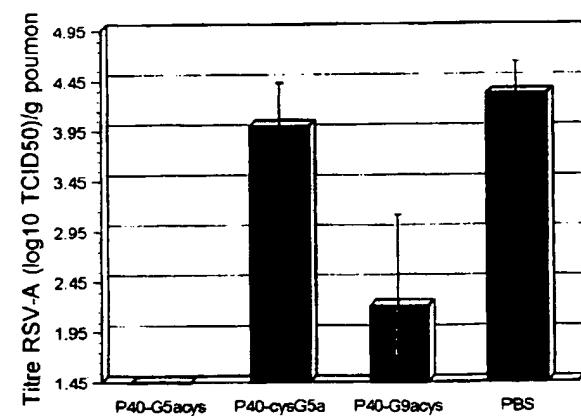
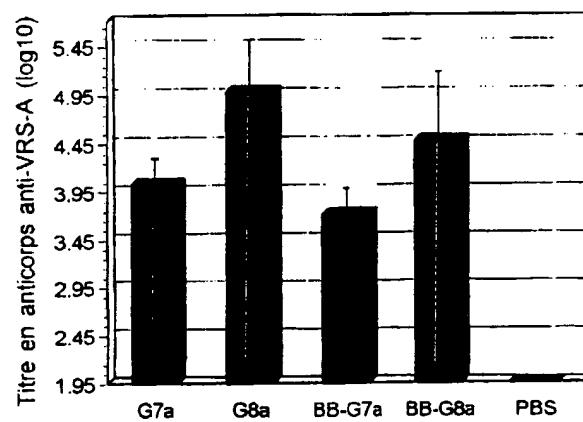
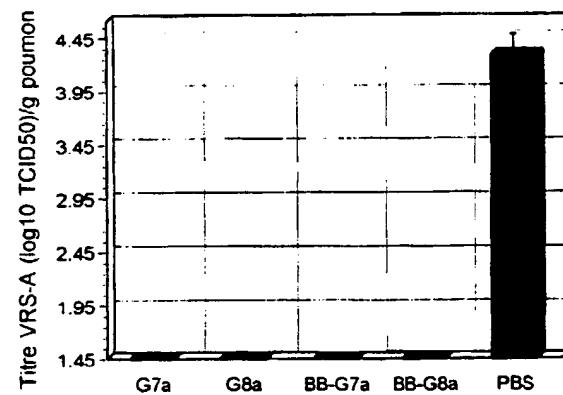
A**B**

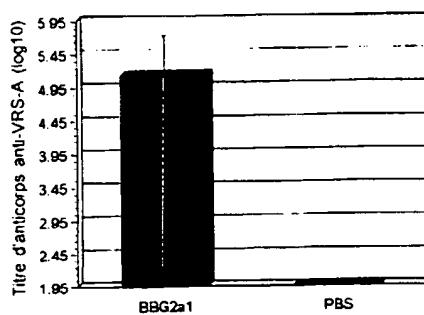
Figure 4

5/10

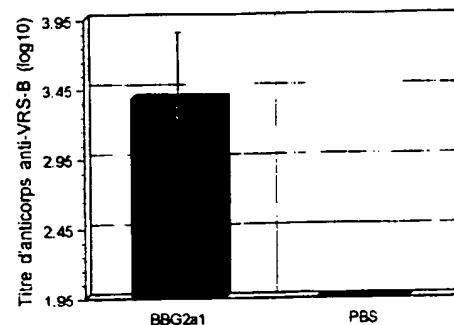
A**B****Figure 5**

6/10

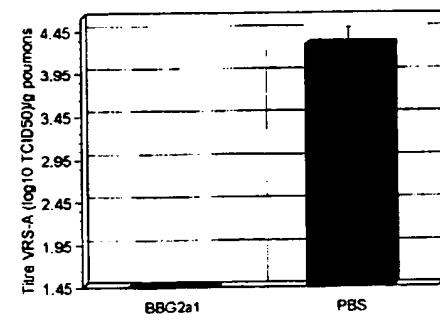
A



B



C



D

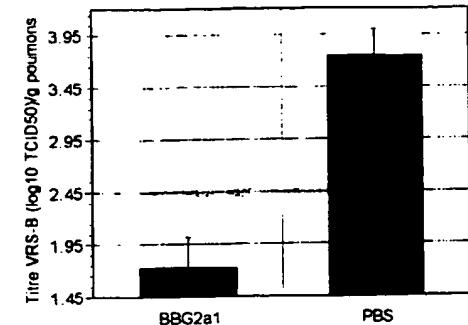


Figure 6

7/10

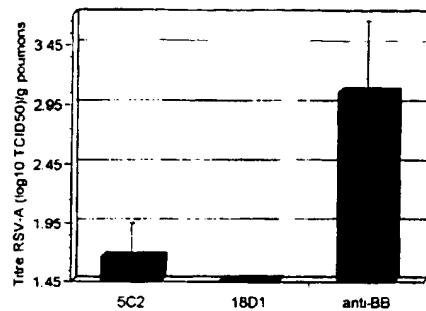


Figure 7

10/10

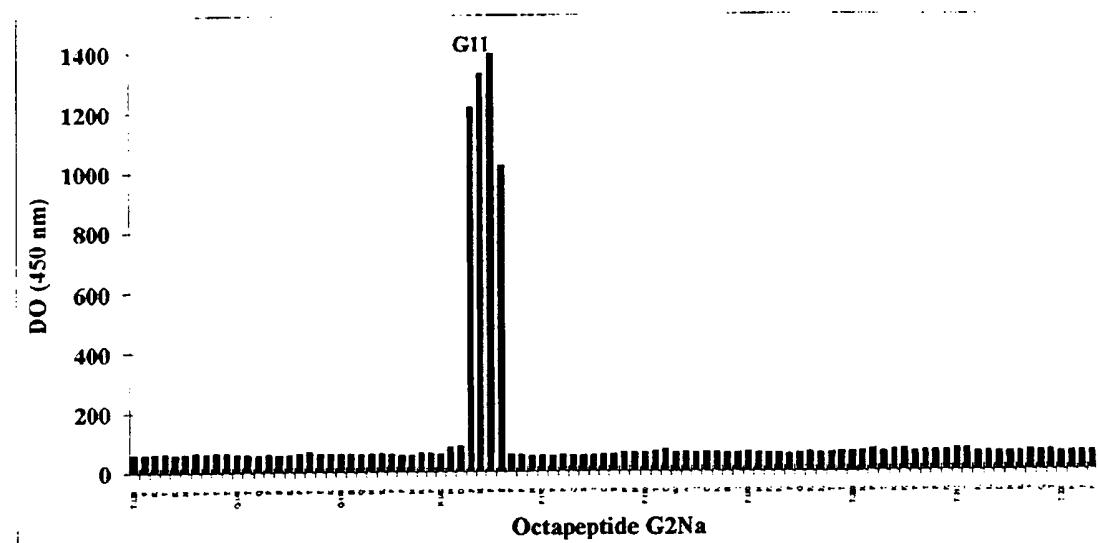


Figure 10

REpublique française

2766192

INSTITUT NATIONAL
d la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

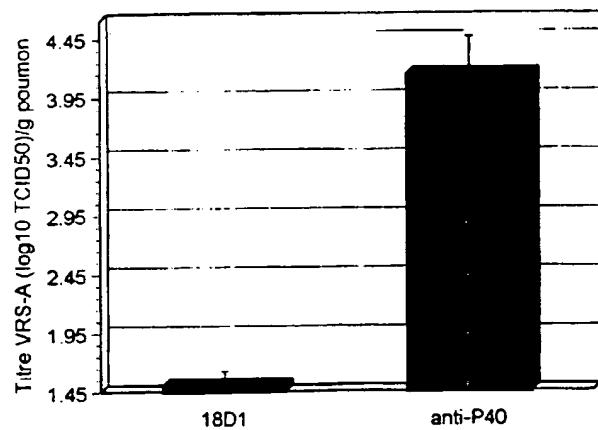
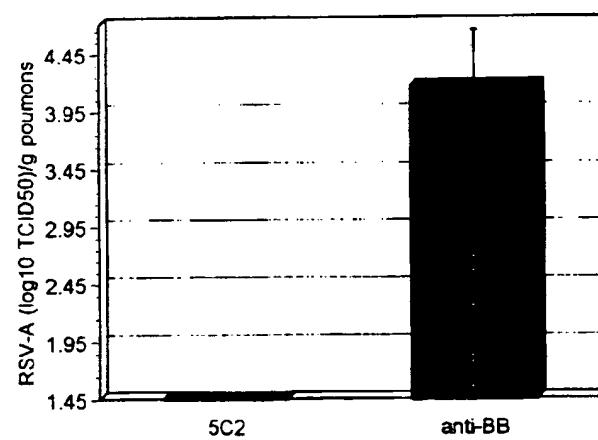
**N° d'enregistrement
national**

FA 546268
FR 9709079

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	<p>SIMARD C ET AL: "EVIDENCE THAT THE AMINO ACID REGION 124-203 OF GLYCOPROTEIN G FROM THE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (RSV) CONSTITUTES A MAJOR PART OF THE POLYPEPTIDE DOMAIN THAT IS INVOLVED IN THE PROTECTION AGAINST RSV INFECTION"</p> <p>ANTIVIRAL RESEARCH,</p> <p>vol. 28, no. 4, 1 janvier 1995,</p> <p>pages 303-315, XP000565377</p> <p>* le document en entier *</p> <p>---</p>	1-33
X	<p>WO 95 27787 A (PF MEDICAMENT ;BINZ HANS (FR); GUYEN NGOC THIEN N (FR); BAUSSANT T)</p> <p>* le document en entier *</p> <p>---</p>	1-33
X	<p>WO 96 14418 A (PF MEDICAMENT ;BINZ HANS (FR); NGUYEN NGOC THIEN (FR); STAHL STEFA)</p> <p>* le document en entier *</p> <p>---</p>	1-33
X	<p>WO 96 14416 A (PF MEDICAMENT ;BINZ HANS (FR); NGUYEN NGOC THIEN (FR); ANDREONI CH)</p> <p>* le document en entier *</p> <p>---</p>	1-33
X	<p>WO 96 14415 A (PF MEDICAMENT ;BINZ HANS (FR); BAUSSANT THIERRY (FR); HAEUW JEAN F)</p> <p>* le document en entier *</p> <p>---</p>	1-33
X	<p>TRUDEL ET AL.: "PROTECTION OF BALB/c MICE FROM RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTION BY IMMUNIZATION WITH A SYNTHETIC PEPTIDE DERIVED FROM THE G GLYCOPROTEIN"</p> <p>VIROLOGY,</p> <p>vol. 185, 1991,</p> <p>pages 749-757, XP002062551</p> <p>* le document en entier *</p> <p>---</p>	1-33
A	<p>WO 89 02935 A (PRAXIS BIOLOG INC)</p> <p>* le document en entier *</p> <p>-----</p>	1-33
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
20 avril 1998		Hagenmaier, S
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul</p> <p>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie</p> <p>A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général</p> <p>O : divulgation non écrite</p> <p>P : document intercalaire</p>		
<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention</p> <p>E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.</p> <p>D : cité dans la demande</p> <p>L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

8/10

A**B****Figure 8**

9/10

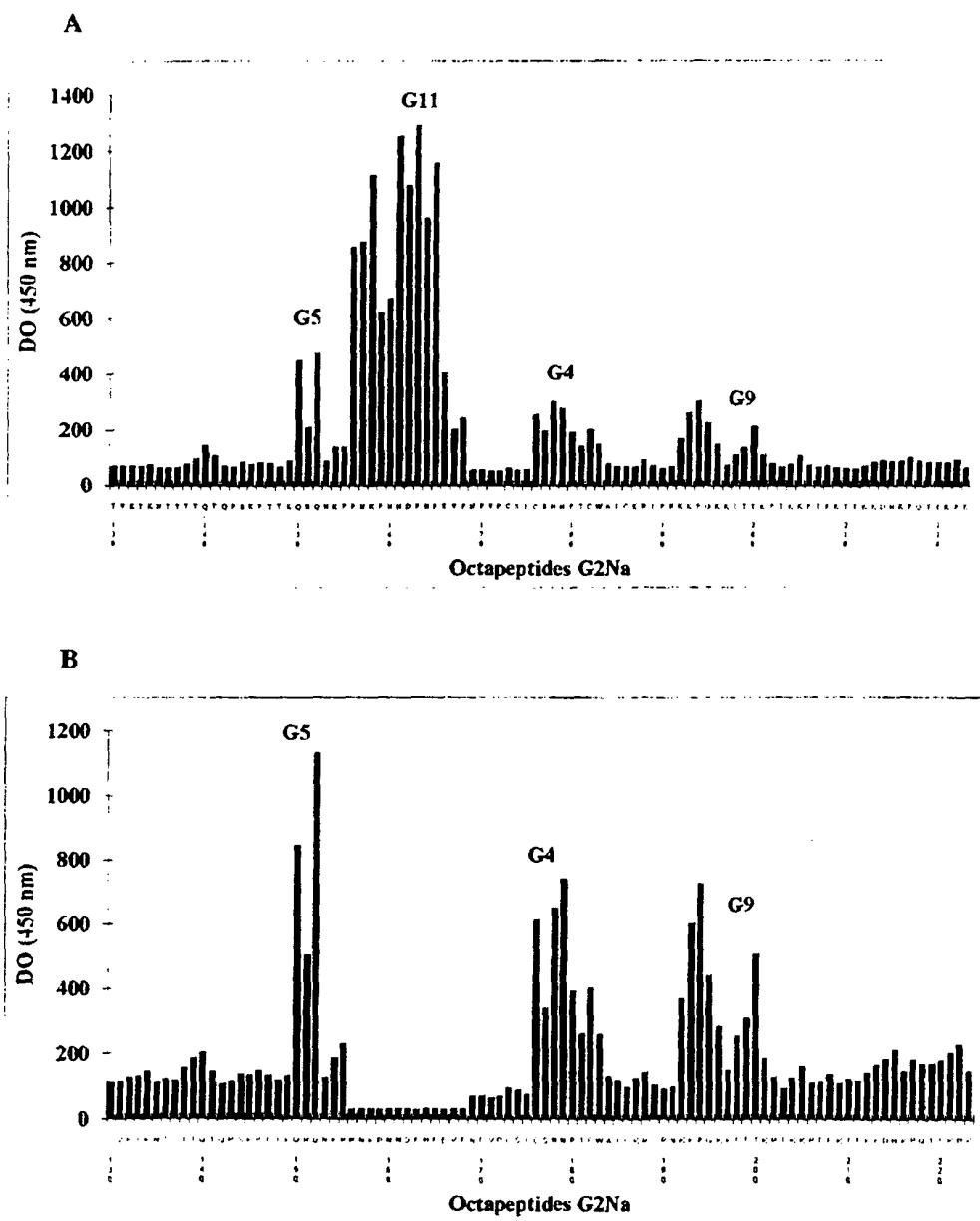


Figure 9